

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Ilmu

Fisiologi, Farmakologi-Toksikologi

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan Desa Kepakisan Kecamatan Batur Kabupaten Banjarnegara dengan ketinggian 1663-2093 meter di atas permukaan laut. Pengumpulan data telah dilaksanakan pada Maret 2014

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik dengan menggunakan rancangan belah lintang.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi Target

Populasi target adalah petani kentang dengan paparan kronik pestisida organofosfat.

4.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah petani kentang dengan paparan kronik pestisida organofosfat di Desa Kepakisan Kecamatan Batur Kabupaten Banjarnegara.

4.4.3 Sampel

Sampel penelitian adalah petani kentang yang menggunakan pestisida organofosfat di Desa Kepakisan Kecamatan Batur Kabupaten Banjarnegara yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

- Menetap selama satu tahun atau lebih di wilayah Desa Kepakisan Kecamatan Batur Kabupaten Banjarnegara
- Jenis kelamin laki-laki
- Umur antara 20-50 tahun
- Memiliki kadar hemoglobin $\geq 12,5$ gr/dl
- Melakukan kegiatan menyemprot pestisida organofosfat selama satu tahun atau lebih
- Memiliki visus normal atau telah terkoreksi
- Memiliki Indeks Massa Tubuh (IMT) $\geq 18,5$

b. Kriteria eksklusi

- Berdasarkan anamnesis ditemukan adanya kelainan saraf
- Berdasarkan anamnesis dijumpai adanya riwayat kebiasaan minum minuman beralkohol
- Berdasarkan anamnesis dijumpai adanya riwayat pemakaian obat penghambat dan pemicu kolinesterase
- Menolak untuk diikutsertakan dalam penelitian

4.4.4. Cara *Sampling*

Subjek penelitian diperoleh dengan cara *purposive sampling* berdasarkan kriteria di atas yang telah ditentukan oleh peneliti.

4.4.5. Besar Sampel

Sesuai dengan desain penelitian yaitu belah lintang, besar sampel dihitung dengan rumus besar sampel untuk proporsi tunggal. Besarnya kesalahan tipe I = 5% ($Z\alpha=1,96$). Besarnya kesalahan tipe II ditetapkan sebesar 20% ($Z\beta=0,842$). Besarnya koefisien korelasi antara aktivitas asetilkolinesterase oleh karena belum diketahui diperkirakan sebesar 0,5 (korelasi derajat sedang). Perhitungan besar sampel adalah sebagai berikut.

$$n = \left[\frac{Z\alpha + Z\beta}{0,5 \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right)} \right]^2 + 3 = \left[\frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln \left(\frac{1+0,5}{1-0,5} \right)} \right]^2 + 3 = 29,02 \approx 30$$

Keterangan:

$$Z\alpha = 1,96 \quad (\alpha = 0,05)$$

$$Z\beta = 0,842 \quad (\beta = 0,2)$$

$$r = 0,5$$

Berdasarkan perhitungan besar sampel jumlah subjek yang dibutuhkan adalah 30 orang petani kentang dengan paparan kronik pestisida organofosfat.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah aktivitas asetilkolinesterase darah.

4.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah waktu reaksi.

4.5.3. Variabel Perancu

Variabel perancu penelitian ini adalah:

- Usia
- Dosis pestisida
- Masa kerja
- Lama kerja per hari
- Frekuensi penyemprotan
- Pemakaian APD
- Kadar hemoglobin

4.6. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel

No	Variabel	Unit	Skala
1	Aktivitas Asetilkolinesterase Darah	%	Rasio
	Aktivitas yang digambarkan dengan besarnya kadar enzim asetilkolinesterase dalam darah diperiksa dengan metode Tintometer untuk pengukuran.	-	Ordinal
	Kategori aktivitas enzim asetilkolinesterase adalah sebagai berikut :		
	1. Normal : > 75%		
	2. Keracunan ringan : 75 – 50%		
	3. Keracunan sedang : 50 – 25%		
	4. Keracunan berat : < 25%		
2	Waktu Reaksi	Milidetik	Rasio
	Waktu reaksi visual pada penelitian ini adalah jarak waktu antara mulai terlihatnya stimulus warna hijau dan munculnya respon menekan tombol.		

No	Variabel	Unit	Skala
3	Usia Usia subjek penelitian ketika penelitian dilakukan yang diketahui dari data tanggal lahir yang tercantum pada kartu identitas ataupun dokumen sejenis. Umur dinyatakan dalam tahun.	Tahun	Rasio
4	Dosis Pestisida Jumlah pestisida organofosfat yang dipakai untuk penyemprotan dalam gram atau cc tiap pencampuran dengan suatu pelarut. Dosis aplikasi yang dianjurkan pada umumnya dalam kisaran 1,5 – 2 cc/L pelarut air. 1. Tak memenuhi syarat apabila $> 1,5$ cc/L pelarut 2. Memenuhi syarat apabila $\leq 1,5$ cc/L pelarut	cc/L	Nominal
5	Masa Kerja Satuan waktu dalam tahun untuk terpajannya suatu pestisida organofosfat di daerah pertanian ataupun rumah.	Tahun	Rasio
6	Lama Kerja per Hari Satuan waktu dalam jam pada saat terpajan pestisida organofosfat per hari di daerah pertanian ketika penyemprotan ataupun di rumah ketika penyimpanan dan pengelolaan. 1. > 8 jam per hari 2. ≤ 8 jam per hari	Jam/hari	Nominal
7	Frekuensi Penyemprotan Jumlah pemakaian pestisida organofosfat untuk penyemprotan di daerah pertanian per minggu 1. Lebih dari 1 kali seminggu 2. Kurang dari 1 kali seminggu	-	Nominal
8	Pemakaian Alat Pelindung Diri Pemakaian alat pelindung diri pada saat kegiatan penyemprotan pestisida organofosfat di daerah pertanian. 1. Pemakaian lengkap 2. Pemakaian tidak lengkap	-	Nominal
9	Kadar Hemoglobin Kadar hemoglobin dalam darah yang dinyatakan dalam satuan gram/dl	gr/dl	Rasio

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

- a. Darah vena
- b. Kapas
- c. Alkohol

4.7.2 Alat

- a. Kuesioner
- b. Alat untuk pengukuran aktivitas asetilkolinesterase darah: spuit dan *Tintometer Lovibond AF267 kit*
- c. Alat elektronik (tablet)

4.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan adalah data kadar kolinesterase responden dan data waktu reaksi responden.

4.7.4 Cara Kerja

Seleksi sampel dilakukan dengan menggunakan kuesioner. Pasien yang memenuhi kriteria inklusi ditetapkan sebagai sampel setelah mendapat penjelasan tentang penelitian dan memberikan persetujuan setelah pemberitahuan (*informed consent*). Pengukuran berat badan, tinggi badan, pengambilan sampel darah vena untuk tes kadar kolinesterase dan kadar hemoglobin serta pemeriksaan waktu reaksi dilakukan pada saat pasien tiba di tempat yang dipersiapkan.

1) Pemeriksaan kadar kolinesterase darah ³⁷

a. Persiapan larutan yang dibutuhkan

Larutan yang dibutuhkan antara lain larutan indikator (yang terdiri atas *Brom Timol Blue* [BTB] dan aquadestilata), larutan substrat (yang terdiri atas Acethylcholine perchlorat dan aquadestilata), dan aquadestilata.

b. Penentuan kadar kolinesterase darah sampel

i. Tes reagen

1) Satu *test tube* diambil kemudian diisi dengan 0,5 cc larutan indikator BTB dan segera ditutup. Sebanyak 0,01 cc darah kontrol (orang yang tidak terpapar pestisida) ditambahkan ke dalam tabung tadi, kemudian dikocok perlahan. Larutan substrat ditambahkan 0,5 cc. Campuran ini dipindahkan ke dalam kuvet (tabung persegi dengan ruang 2,5 mm), kemudian ditempatkan di ruangan sebelah kanan pada komparator. Komparator dipegang dan dihadapkan pada sinar matahari.

2) Disk dari komparator tersebut diputar sampai didapatkan warna yang sama antara warna sebelah kanan dan sebelah kiri pada kaca komparator tersebut dan persentasenya dibaca. Hasilnya tidak boleh melebihi 12,5%. dan dipanaskan jika hasilnya melebihi 12,5%.

ii. Sampling darah

- 1) Kuvet-kuvet 2,5 cc disiapkan. Satu sampel dari kontrol diambil dan darah blanko dibuat dengan cara menambah 0,01 cc darah ke dalam 1 cc aquadestilata kemudian dimasukkan ke dalam kuvet 2,5 cc. Kuvet ditempatkan di ruangan sebelah kiri komparator. Kemudian dengan pipet 0,5 cc larutan indikator ditambahkan.
- 2) Darah kontrol diambil lagi sebanyak 0,01 cc dan dimasukkan dalam tabung 1 sebelah kiri. Pipet kemudian dibilas dengan larutan indikator dalam tabung dan sampel darah diambil sebanyak 0,01 cc dari masing-masing responden dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung secara berurutan. Setiap memasukkan sampel darah ke dalam tabung, pipet harus selalu dibilas dengan larutan indikator.

iii. Penambahan Larutan Substrat





- 1) Sebanyak 0,5 cc larutan substrat ditambahkan ke dalam tabung kontrol. Waktu pada saat menambahkan larutan substrat dicatat (yaitu waktu 0.00/ *time zero*) kemudian campuran larutan dipindahkan ke dalam kuvet 2,5 mm dan diperhatikan warnanya pada komparator. Mulai dari tabung responden pertama, sebanyak 0,5 cc larutan substrat ditambahkan ke dalam tabung reaksi setiap 1 menit tepat dari waktu 0. Tabung segera ditutup.
- 2) Warna dari sampel kontrol yang berada dalam komparator diperiksa dan ditunggu sampai campuran dalam kuvet mencapai

100% warna aktif, yang tergantung pada suhu ruangan, dan waktunya dicatat. Selanjutnya campuran dalam kuvet kontrol dibuang, setiap 1 menit isi dari tabung-tabung berikutnya dipindahkan ke dalam kuvet. Kuvet dimasukkan ke dalam ruangan sebelah kanan dari komparator. Disk dari komparator diputar dengan menghadap ke arah sinar matahari sehingga diperoleh warna yang sama antara warna sampel dengan warna dari kaca perbandingan dalam disk. Angka yang diperoleh dicatat.

c. Analisa hasil pemeriksaan

Hasil berupa angka persentase didapatkan berdasarkan tabel warna pada kaca perbandingan dalam disk (*Tintometer Lovibond AF267*) berikut:

Tabel 3. Interpretasi warna

Gambar	Warna	Interpretasi
	Kuning	Normal: > 75 %
	Kuning kehijauan	Keracunan ringan: 75 % - 50 %
	Hijau	Keracunan sedang: 50% – 25%
	Biru	Keracunan berat: < 25%

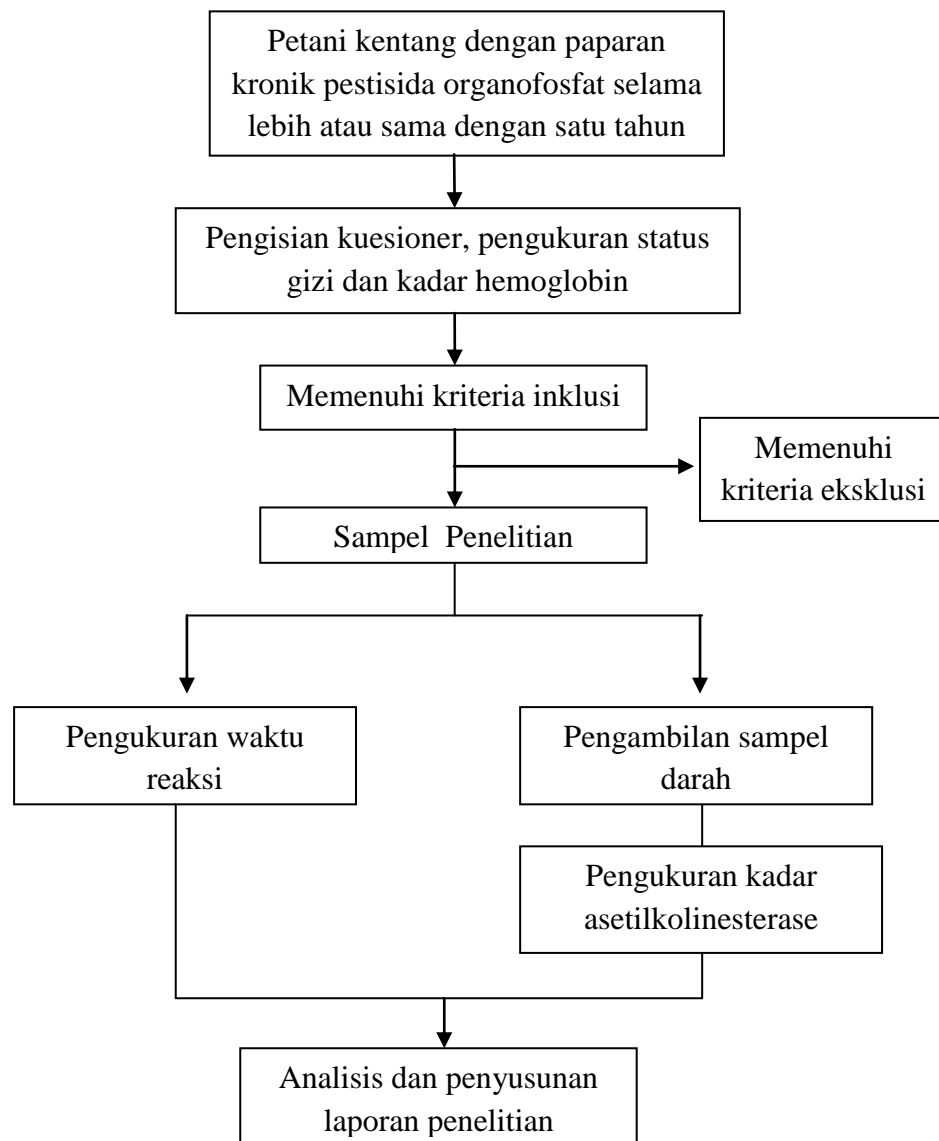
2) Pengukuran waktu reaksi ⁸

Waktu reaksi diukur dengan metode pilihan (*choice*) menggunakan perangkat lunak tablet Android *Reaction Time*.

- Membuka aplikasi pengukuran waktu reaksi.
- Menekan tombol mulai, menunggu hingga warna hijau muncul, menekan tombol yang sudah ditentukan dengan segera.

- Aplikasi akan menampilkan waktu yang dibutuhkan dari munculnya warna hijau hingga tombol ditekan akan muncul dalam satuan milidetik.
- Mengukur waktu reaksi sebanyak tiga kali per orang.³⁰
- Menghitung rata-rata dari ketiga hasil pengukuran untuk dianalisis.¹⁰

4.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Bagan alur penelitian

4.9 Analisis Data

Data yang terkumpul sebelum dianalisis telah diperiksa kelengkapan dan kebenaran datanya. Data selanjutnya diberi kode, ditabulasi, dan dimasukkan ke dalam komputer.

Normalitas distribusi data dianalisis dengan uji Saphiro-Wilk. Hasil uji Saphiro-Wilk menghasilkan nilai $p \leq 0,05$ maka data dianggap berdistribusi tidak normal. Data yang berskala kontinyu seperti usia, masa kerja dan kadar hemoglobin dideskripsikan dalam bentuk rerata dan simpang baku karena distribusi data normal, sedangkan waktu reaksi dan aktivitas asetilkolinesterase darah dideskripsikan dalam bentuk rerata dan median karena distribusi data tidak normal. Data yang berskala kategorial seperti kategori aktivitas asetilkolinesterase, dosis pestisida, frekuensi penyemprotan, lama kerja per hari, dan penggunaan APD dideskripsikan sebagai distribusi frekuensi dan persentase. Data ditampilkan dalam bentuk tabel ataupun diagram.

Uji hipotesis untuk korelasi antara aktivitas asetilkolinesterase darah dengan waktu reaksi diuji dengan uji korelasi Spearman karena berdistribusi tidak normal. Pengaruh variabel perancu berskala kontinyu terhadap hubungan antara aktivitas asetilkolinesterase dengan waktu reaksi telah dianalisis dengan uji regresi linier. Pengaruh variabel perancu yang berskala kategorial dianalisis dengan uji Mann-Whitney. Analisis statistik menggunakan program komputer.

4.10. Etika Penelitian

Protokol penelitian telah dimintakan persetujuan dan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Seluruh calon subjek penelitian telah diberikan penjelasan lengkap tentang prosedur penelitian, tujuan dan manfaat penelitian. Calon subjek yang setuju untuk ikut serta dalam penelitian telah diminta persetujuannya dalam bentuk *informed consent* tertulis. Calon subjek penelitian bebas menolak untuk diikutsertakan dalam penelitian ataupun keluar dari penelitian. Identitas subjek penelitian dirahasiakan dan tidak dipublikasikan tanpa seijin subjek penelitian. Seluruh subjek penelitian telah diberikan imbalan sesuai dengan kemampuan peneliti.